

ÜBER DEN EINFLUSS DES PILOCARPINS AUF DIE
KATALASEAKTIVITÄT INKUBierter KÄLBERLINSEN

von

Hans Karl von Liel

aus

Landshut

1980



Digitized by the Internet Archive
in 2026

Aus der Augenklinik mit Poliklinik
der Universität Erlangen-Nürnberg
Direktor: Professor Dr. E. Schreck

ÜBER DEN EINFLUSS DES PILOCARPINS AUF DIE KATALASEAKTIVITÄT INKUBIERTER KÄLBERLINSEN

INAUGURAL - DISSERTATION
zur Erlangung der Doktorwürde
der Medizinischen Fakultät
der Friedrich-Alexander-Universität
Erlangen-Nürnberg

vorgelegt
von
Hans Karl von Liel
aus
Landshut

Gedruckt mit Erlaubnis der Medizinischen Fakultät
der Universität Erlangen-Nürnberg



Dekan: Prof. Dr. W. Kersten

Referent: Prof. Dr. U. Mayer

Korreferent: Prof. Dr. E. Schreck

Tag der mündlichen Prüfung: 17.11.1980

INHALTSVERZEICHNIS

=====

1.	EINLEITUNG	1
2.	ALLGEMEINE GRUNDLAGEN	3
2.1.	PILOCARPIN	3
2.1.1.	Geschichtliche Entwicklung	3
2.1.2.	Im Kammerwasser erreichbare Pilocarpinkonzentration bei konjunktivaler Applikation	5
2.1.3.	Durch Pilocarpin hervorgerufene Schädigungen und Stoffwechsel- veränderungen	8
2.2.	KATALASE	11
2.2.1.	Geschichtliche Daten	11
2.2.2.	Definition und Wirkungsweise	12
2.2.3.	Chemische Daten	14
2.2.4.	Eigenschaften	14
2.2.4.1.	Temperaturabhängigkeit	14
2.2.4.2.	pH-Abhängigkeit	15
2.2.4.3.	H ₂ O ₂ -Konzentration	16
2.2.5.	Vorkommen der Katalase	16

2.2.6.	Physiologische Funktion der Katalase	19
2.2.6.1.	Bedeutung in Erythrocyten	19
2.2.6.2.	Katalase bei Virusinfektion . . .	21
2.2.6.3.	Katalase und Bakterienvirulenz . .	21
2.2.6.4.	Katalase im Auge	22
3.	MATERIAL UND METHODE	24
3.1.	MATERIALGEWINNUNG	24
3.1.1.	Präparation	25
3.2.	ZUSAMMENSETZUNG DES NÄHRMEDIUMS	26
3.3.	VERLAUF DER VERSUCHE	29
3.3.1.	Versuch im Warburg-Apparat	29
3.3.1.1.	Versuchsansatz im Warburg-Apparat.	30
3.3.1.2.	Technische Durchführung	31
3.3.1.3.	Berechnung der entwickelten Sauerstoffmenge	32
3.3.2.	Eiweißbestimmung	33
4.	VERSUCHSERGEBNISSE UND IHRE STATISTISCHE BEWERTUNG	34

5.	DISKUSSION	45
6.	ZUSAMMENFASSUNG	48
7.	LITERATURVERZEICHNIS	50

1. EINLEITUNG

Das Parasympathicomimeticum Pilocarpin ist bis heute als Standardmittel für die Behandlung des Glaukoms in Gebrauch. Viele Patienten sind darauf angewiesen, unter Umständen 20 Jahre und länger 3 x täglich 3%ige Pilocarpin-Augentropfen und abends ein 2%iges Pilocarpin-Öl in den Bindehautsack zu träufeln. Es hat sich schon eingebürgert, das Ausmaß der Wirksamkeit anderer Miotica wie Echothiopat-Jodid (HARRIS) und Aceclidin (DRANCE und Mitarbeiter) mit derjenigen einer bestimmten Pilocarpin-Dosis zu vergleichen.

In ihrer Habilitationsschrift "Untersuchungen an Gewebekulturen aus Kälberaugen" führte U. MAYER eine Reihe von katarakt-auslösenden oder verstärkenden Linsenbeschädigungen auf. Eine Linsen-trübung kann ausgelöst werden durch radioaktive Strahlen, ionisierende und Röntgenstrahlen, durch Stoffwechselstörungen,

besonders des Kohlenhydratstoffwechsels, durch kataraktogene Gifte und auch medikamentös angewandte Substanzen in Form einer Nebenwirkung (vergl. HOCKWIN, KOCH u.M.) Von KREJCI und HARRISON wurden Pilocarpin, Carbachol und Neostigmin unmittelbar mit kultivierten Hornhautepithelien in Berührung gebracht, wobei sie eindeutig toxisch wirkten. Andererseits gelang es KOCH, DÜMLING, HOCKWIN und RAST nicht, durch subkonjunktivale Injektion von Pilocarpin eine Katarakt auszulösen, also das Linsenepithel definitiv zu schädigen. HOCKWIN und Mitarbeiter erkannten die Bedeutung des Zusammentreffens multipler Schädigungsfaktoren, deren einzelner zur Bildung einer Linsentrübung nicht ausreichte, deren Summierung jedoch einen irreversiblen Schaden für die Linse brachte. HOCKWIN prägte den Ausdruck Additions-katarakt. Pilocarpin gehört also nach HOCKWIN und RAST nicht zu den direkt kataraktogenen Medikamenten. Wieweit der Einfluß des Pilocarpins

auf den aeroben Stoffwechsel der Linse eine Teilschädigung der letzteren bewirkt, soll in dieser Arbeit an Hand der Katalaseaktivität untersucht werden.

2. ALLGEMEINE GRUNDLAGEN

2.1. PILOCARPIN

2.1.1. GESCHICHTLICHE ENTWICKLUNG

Zur geschichtlichen Entwicklung von Pilocarpin erschien 1976 von J.WOLLENSAK und H.KEWITZ die zusammenfassende Arbeit "100 Jahre Pilocarpin in der Augenheilkunde". A.WEBER veröffentlichte am 28.Okt.1876 eine grundlegende Arbeit mit dem Titel "Über die Wirkung des Pilocarpium muriaticum".

Bereits ein Jahr später gibt WEBER in einer umfassenden Studie über die Ursache des Glaukoms seine Erfahrungen mit dem neuen Medikament wieder: " Eine ungleich wärmere Empfehlung zur Vor-und Nachbehandlung bei Glaukom kann ich dagegen dem Pilocarpin auf den Weg geben. Ich lebe in der Hoffnung, dass bei manchem chronischen und einfachen Glaukom die Iridektomie durch seine Anwendung ersetzt, eine große Zahl unzu-

reichender Operationserfolge auf jeden Fall korrigiert werden kann. "Mit 'ungleich wärmer' war der Vergleich mit Eserin gemeint, gegen das er im vorangehenden Abschnitt der Arbeit einige Bedenken angemeldet hatte. Den ersten Beweis der therapeutischen Wirksamkeit einer konsequenten Langzeittherapie mit Eserin oder Pilocarpin erbrachten W.ZENTMAYER und W.C. POSEY, die bereits 1895 die Ergebnisse einer vergleichenden therapeutischen Studie an 167 randomisiert zugeweilten Glaukom-Patienten vorgelegt haben, in der die Behandlungszeiten zwischen 5 und 15 Jahren lagen und gezeigt wurde, dass die bei Beginn der Behandlung vorhandene Sehkraft über Jahre erhalten bleiben kann. Bis in die neueste Zeit hat es dann gedauert, den drucksenkenden Effekt des Pilocarpin beim Glaukom chronicum experimentell darzulegen; danach kommt es in erster Linie durch eine Verbesserung des Abflusses im Kammerwinkel zustande. Möglicherweise spielt ein histaminähnlicher Faktor auf die Endothelzelle des Schlemmschen Kanals eine Rolle.

Ein Einfluß auf die Sekretion des Kammerwassers ist gering, falls überhaupt vorhanden (BILL, 1967 und 1975).

2.1.2. IM KAMMERWASSER ERREICHBARE PILOCARPIN-
KONZENTRATION BEI KONJUNKTIVALER
APPLIKATION

Die einfachste Steigerungsmöglichkeit der Resorption besteht in der Erhöhung der Pilocarpinkonzentration in der einzuträufelnden Lösung. ASSEFF und Mitarbeiter sowie HARRIS fanden, dass sich ab einer Konzentration von 4% keine Steigerung der Pilocarpinresorption mehr messen lässt. LYONS und KROHN, wie auch HARRIS und GALIN berichten über eine Abhängigkeit der resorptierten Pilocarpinmenge von der Pigmentierung des Auges. BORGMANN und WURSTER berichten von der Abhängigkeit des "Vehikels"; GREEN und DAWNS fanden bei einer Trägersubstanz, die 1,67% Polyvinylpyrrolidone und andere wasserlösliche Polymere und 1% Hydroxypropylemethylcellulose enthält,

nach 30 Minuten als Höchstwert 3,5 $\mu\text{g}/0,1 \text{ ml}$ bei der Gabe von 2%iger Pilocarpinlösung.

Bedeutend ist die Beobachtung von RAMER und GASSET, dass ein höherer pH eine größere Pilocarpinresorption bedingt; beispielsweise war bei einem pH von 7,5 die Aufnahme in das Kammerwasser doppelt so groß wie bei einem solchen von 4,0.

Nach MÜLLER, HOCKWIN und KLEIFELD gelangt nach Einträufeln von 2%iger Pilocarpinlösung in den Bindehautsack etwa $1/5$ der Menge ins Kammerwasser. Dadurch soll die Sauerstoffaufnahme in die ganze Linse gehemmt werden, wie es MAYER in Gewebekulturen zeigen konnte.

Unabhängig von der maximal zu erreichenden Konzentration genügt schon ein Tropfen 2%iges Pilocarpin, um vom Bindehautsack aus einen Akkommodationsspasmus zu erzeugen, was beweist, dass es in wirksamer Menge ins Kammerwasser übergeht.

ABRANSON, COLEMAN, FORBES und FRANZEN konnten nach Gabe der gleichen Konzentration mit Hilfe der Ultraschall-Biometrie die Tiefe der Vorderkammer und die Dicke der Linse messen.

Die Veränderungen von der 45. bis zur 100. Minute entsprachen jener bei der natürlichen Akkommodation. Dies wurde als Zeichen für die hohe Resorptionsquote dieses Mittels gewertet.

Ganz neue Forschungen zu diesem Thema stammen von ELLIS, LITTELJOHN und DEITRICH. Sie prüften die enzymatische Hydrolyse von Pilocarpin durch Kaninchen- und Menschen-Serum, sowie durch Augen- und Lebergewebe. Hierbei fand sich die Enzymkonzentration am höchsten in Uvea- und Netzhautgewebe, und am geringsten in der Linse.

Die höchste der dabei untersuchten Pilocarpindosen betrug $6,6 \times 10^{-3}$ M. Das ist weniger als $1/3$ der in vorliegenden Versuchen verabreichten Menge von 2×10^{-2} M (0,5g/100 ml).

Nach allem scheint die Iris bis zu einem gewissen Grade die Linse vor Pilocarpin zu schützen.

2.1.3.

DURCH PILOCARPIN HERVORGERUFENE SCHÄDIGUNGEN
und STOFFWECHSELVERÄNDERUNGEN

Einen weiteren Hinweis auf die Schutzfunktion von Iriszellen für das Linsenepithel zeigt U.MAYER bei Untersuchungen über den Sauerstoff- und Glukoseverbrauch beider Zellarten ohne und mit Pilocarpinzusatz. Dabei sinkt der Sauerstoffverbrauch bei den Epithelien auf $1/3$, während er bei den bradytropheren Iriszellen auf fast die doppelte Menge ansteigt.

Der Glukoseverbrauch beider Gewebe sank unter der Gabe von Pilocarpin ab, jedoch nicht signifikant. Pilocarpin wird demnach von MAYER nicht zu den allein katarakt-auslösenden Substanzen gezählt, da nicht Sauerstoff- und Glukoseverbrauch in beiden Geweben in gleichem Maße verringert werden.

Ebenso bezweifelten 1966 NORDMANN und GERHARD das Vorkommen einer Pilocarpinkatarakt.

HOCKWIN und Mitarbeiter weisen jedoch die Mitbeteiligung von Pilocarpin bei einer experimentellen Kataraktauslösung nach. Es war auch

ihnen nicht möglich, durch subconjunctivale Injektion von Pilocarpin allein eine Trübung der Linse hervorzurufen. Dies gelang erst bei zusätzlicher Röntgenbestrahlung.

Anlässlich dieser Beobachtung prägten sie den Ausdruck: Additionskatarakt.

Eine ähnliche Summierung von unterschwelligen Schädigungen entsteht durch die von van HEYNINGEN beschriebene 30%ige Hemmung der Glucose-6-Phosphat-Dehydrogenase durch Pilocarpin zusammen mit Naphthochinon.

Über die so erzeugte Linsentrübung berichten CARENINI und ORZALESI.

Wie gerade Störungen im Kohlehydratstoffwechsel eine häufig kataraktogene Schädigung der Linse bedeuten, zeigt die von POHJOLA und RAIVIO beschriebene Cataracta zonularis bei idiopathischer infantiler Hypoglykämie, sowie durch die Katarakt bei Galactosaemie (KINOSHITA) und die allgemein bekannte Veränderung der Linse bei Diabetes mellitus.

Eine Schädigung von Kaninchen- und Menschen-Cornealepithel durch Pilocarpin und sechs andere antiglaukomatös wirksame Substanzen konnten KREJCI und HARRISON nachweisen. Dabei ist zu berücksichtigen, dass das geprüfte Gewebe unmittelbar mit der eingetäufelten Substanz in Berührung kommt, eine für Linsenepithelien unphysiologische Gegebenheit. Dabei zeigte sich Pilocarpin als am wenigsten toxische Substanz.

JAKOVLEV wies polarographisch eine Hemmung der oxydativen Vorgänge im Auge durch Pilocarpin nach.

Ein Beitrag zur Aufklärung der physiologischen Wirkung von Pilocarpin wurde von KOVACIK, MRAZOVA und JEZEK veröffentlicht. Sie beschreiben eine Erhöhung der Acetylcholin-Konzentration im Ciliarkörper von Rinderaugen nach Einwirkung von Pilocarpin.

Es zeigte sich eine um $1/4$ erhöhte Acetylcholin-Konzentration. Die Autoren sind jedoch der Meinung, dass nur ein Bruchteil des Pilocarpin seine cholinerge Reaktion am Rezeptor entfaltet. Der restliche Anteil soll vom Gewebe aufgenommen oder ausgeschieden werden.

2.2. KATALASE

2.2.1. Geschichtliche Daten

Die Eigenschaft verschiedener Gewebe, Wasserstoffsuperoxyd zu zersetzen, wurde von THENARD im Jahre 1819 zunächst als eine gemeinsame Wirkungsweise, die allen lebenden Zellen eigen ist, beschrieben. (SCHÖNBEIN), 1963).

Katalase nannte 1901 LOEW ein bestimmtes Ferment, welches die Fähigkeit besitzt, aus Wasserstoffperoxyd gasförmigen Sauerstoff freizusetzen. 1937 gelang es SUMNER und DOUNCER erstmalig, die Katalase in reiner Form darzustellen.

LIEBERMANN hatte bereits im Jahre 1904 nachgewiesen, dass diese H_2O_2 -zersetzende Substanz in Glaskörper sowie in Linse des Auges vorhanden ist. Zu weiteren Daten über die geschichtliche Entwicklung der Katalase sei auf die ausführliche Literaturzusammenfassung bei U. MAYER, 1962 verwiesen.

2.2.2.

Definition und Wirkungsweise

Die Zerstörung des Wasserstoffsuperoxyd, welches in lebenden Zellen entsteht und ein starkes Zellgift darstellt, erfolgt durch Katalase und Peroxydase. Durch die Enzymgruppen werden H_2O_2 in Wasser und Sauerstoff gespalten. Dabei setzt die Katalase molekularen Sauerstoff frei, während Peroxydasen den Sauerstoff auf einen neuen Empfänger übertragen.

Der aktive Katalase- H_2O_2 -Komplex wird zunächst bei der H_2O_2 -Umsetzung gebildet.

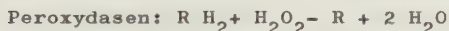
Ein zweites H_2O_2 -Molekül dient dem Komplex als H-Spender.

Wie AEBI im Jahre 1970 feststellte, verläuft die Zersetzung sehr schnell mit

einer Geschwindigkeitskonstanten

$$k = 10^7 \text{ sec}^{-1} \text{ Mol}^{-1}.$$

Der Verlauf der Reaktionen erfolgt nach folgenden Gleichungen:



(siehe BEYER).

Der Katalase wird, ausser der beschriebenen Reaktion auch eine peroxydatische

Funktionsmöglichkeit zugeschrieben, wo-

bei beide Reaktionen prinzipiell gleich

verlaufen, nur dass der Sauerstoff zur

Oxydation weiterer Stoffwechselprodukte

benutzt wird (KELLIN und HARTREE, 1945;

THEORELL, 1948; HELLER, 1969; AEBI, 1970.

2.2.3. Chemische Daten

Katalase setzt sich aus einem Protein als Apoferment und dem Hämin als Coferment zusammen. Es wird in die Funktionsklasse der Oxydoreduktasen und in die Stoffklasse der Chromoproteine gerechnet. Das Enzym enthält 4 Ferriprotoporphyringruppen pro Molekül, in dem das zentrale Eisenatom charakteristischerweise seine 3-Wertigkeit nicht ändert.

Das Molekulargewicht wird mit 240.000 angegeben (LEHNARTZ, 1949; KARLSON, 1974), ausserdem der Hämingehalt mit 1,1% und der Eisengehalt mit 0,09% (AEBI, 1970).

2.2.4. Eigenschaften

2.2.4.1. Temperaturabhängigkeit

Wie bei allen Enzymen besteht auch bei der Katalase eine Temperaturabhängigkeit CHODAT (1939).

Bei 0° Celsius ist die Wirksamkeit herabgesetzt um mit steigender Temperatur ebenfalls anzuwachsen; ab 45° Celsius beginnt die zunehmende Denaturierung.

AEBI (1970) gibt einen Temperaturabhängigkeitsquotient $Q_{10} = 1,12$ an.

FAINE (1960) stellt ein Wirkungsoptimum bei 37° Celsius fest; demgemäß wurde in vorliegenden Untersuchungen bei 37° Celsius gearbeitet.

2.2.4.2.

pH-Abhängigkeit

Die Enzymaktivität ist abhängig von der Wasserstoff-Ionenkonzentration. Säuren schädigen die Katalase (CHODAT, 1939).

HERMEL und HAVEMANN (1966) geben ein Wirkungsmaximum bei pH 7,5-8,0 an.

MAYER arbeitete, wie auch an anderen Stellen angegeben (FAINE, 1960) bei einem pH der optimalen Wirkung von 6,8.

Die vorliegenden Versuche wurden in Sörensen-Phosphat-Puffer bei pH 6,8 durchgeführt.

2.2.4.3. H₂O₂-Konzentration

Die Geschwindigkeit der Katalasereaktion verhält sich annähernd proportional der jeweiligen Persoxydkonzentration in einem Konzentratsbereich von 0,01 M - 0,05 M (AEBI, 1970).

SENER (1903) nennt als optimale Konzentration 0,03 M - 0,1 M. Stärkere Konzentrationen von über 0,1 M führen zu einer Schädigung des Ferments.

2.2.5. Vorkommen der Katalase

1901 beschrieb LÖEW, der Entdecker der Katalase, dass kein Gewebe tierischer oder pflanzlicher Herkunft ohne dieses Ferment existiere. 1939 untersuchte CHODAT den Katalasegehalt von Getreidekörnern. Dabei zeigte sich eine geringe Konzentration in ruhenden Körnern sowie ein Ansteigen der Katalase-Aktivität bei steigender Atmungsintensität.

In chlorophyllhaltigen Blättern ist der Gehalt des Fermentes höher als in hellen chlorophyllarmen Blättern. BEYE wies in Kressekeimlingen die schädigende Wirkung von verschiedenen Isektiziden auf die Katalase nach.

Bei Pilzen ist stets Katalase vorhanden.

CHODAT gab eine Methode zur Katalasegewinnung aus *Sterigmatocystis nigra* an.

An Bakterien wurden weitgehende Untersuchungen über Katalasegehalt und Funktionszustand gemacht. In Verbindung mit dem Katalasenachweis in Bakterien wiesen GRUMBACH und KIKUTH auf eine Einteilungsmöglichkeit der Mikroorganismen entsprechend der Oxydationsfähigkeit hin: In Aerobier, in Anaerobier sowie fakultativer Anaerobier, die eine doppelte Fermentausstattung besitzen sollen, was ihre Lebensfähigkeit unter aeroben sowie unter aneroben Verhältnissen erklären kann.

Fast in allen tierischen Geweben wurde Katalase nachgewiesen. Gewebe und Organe lassen sich nach ihrer abnehmenden Katalase-Aktivität wie folgt ordnen (CHODAT in E.ABDERHALDEN, 1939) : Leber, Niere, Magen, Schleimhaut, Speichendrüsen, Lunge, Pankreas, Hoden, Herz, Muskel, Hirn, Knorpel, Glaskörper, Linse, Fett.

LIEBERMANN wies 1904 die Anwesenheit von Katalase in der Linse sowie im Glaskörper nach.

ZELLER untersuchte die Quantität der Katalase 1953 und kam nach seinen Messungen zu dem Schluss, dass die Aktivität gering sein müsse. DE CONCILLIS beschreibt Katalasewirkung in Flüssigkeiten und Geweben im Auge, welche in der Linse deutlicher ist.

BHUYAN und BHUYAN veröffentlichten 1970 in einer umfassenden Arbeit einen Vergleich der Katalaseaktivität in verschiedenen Augengeweben.

Den größten Gehalt finden sie im Linsenepithel und Cornealepithel, sehr niedrig ist der Gehalt des Glaskörpers, in Linsenfasern können sie keine Katalase mehr nachweisen. Innerhalb der Zelle finden sie die höchste Aktivität in der Fraktion der Mikrosomen.

2.2.6. Physiologische Funktion der Katalase

2.2.6.1. Bedeutung in Erythrocyten

Auf die eventuelle Wichtigkeit des Fermentes in roten Blutzellen wiesen WARBURG und Mitarbeiter hin; sie untersuchten die Wirkung der Röntgen-Strahlung auf Hämoglobin und fanden Methämoglobinbildung in Abwesenheit von Katalase, die in Gegenwart von Katalase nicht auftrat.

Bereits ZELLER hatte 1953 auf den Zusammenhang zwischen ionisierenden Strahlen und Wasserstoffperoxydentstehung aufmerksam gemacht, da durch Strahlen in Gegenwart von Sauerstoff H_2O_2 entsteht.

NICHOLS beschäftigte sich ausführlich mit der Katalasefunktion in Erythrocyten: intrazelluläre Katalase beseitigt 99,9% des anfallenden Wasserstoffperoxydes, ob dieses nun von aussen zugefügt oder von der Zelle produziert wurde. Sein Schluss bezüglich der Funktion lautete: die Rolle der Katalase besteht in einem Schutzmechanismus für Hämoglobin nach katalatischer Reaktionsweise; jedoch schloss er nicht aus, dass noch andere Schutzsysteme existieren. Hier gibt er einen Hinweis auf den Gedanken an die Evolution - dass diese Aufgabe möglicherweise früher in der biologischen Entwicklung diesem Enzym zustand und heute teilweise von anderen Systemen übernommen wurde.

AEBI gibt 1970 die Bestätigung, dass die Katalase Hämoglobin und andere SH-haltige Proteine vor Methämoglobinbildung bzw. Oxydationsvorgängen durch oxydierende Sub-

stanzen schützt (u.a. Ascorbinsäure, Wasserstoffperoxyd und Röntgenstrahlen). Der gleichen Ansicht schliessen sich ZAPP und Mitarbeiter 1959 an.

2.2.6.2. Katalase bei Vierungsinfektion

KLAMERTH untersuchte 1960 den Katalasegehalt an Chorioallantois-Membranzellen, die durch Influenzaviren infiziert waren im Vergleich zu nicht infizierten Zellen. Er fand eine Erniedrigung der Katalase in den infizierten Zellen und schloss daraus auf pathologische Veränderungen der Oxydationsvorgänge nach Schädigung der Katalase.

2.2.6.3. Katalase und Bakterienvirulenz

An Tuberkelbakterien gilt die Katalase als eine Methode der Virulenzbestimmung. MIDDLEBROOK und COHN zeigten 1953, dass ein Katalaseverlust und eine Virulenzabnahme einhergehen mit INH-Resistenz.

Bestätigung erhielt diese Aussage durch KNOX et al. (1955).

MAYER und ZIMMERMANN zeigten in einer Arbeit 1962 an verschiedenen Stämmen von Salmonella typhimurium, dass die Katalaseaktivität nicht direkt von der Atmungsintensität abhängig ist. Jedoch wiesen sie ein paralleles Verhalten von Katalaseaktivität und Virulenz der einzelnen Stämme nach.

2.2.6.4. Katalase im Auge.

Neben der katalatischen Schutzfunktion und der peroxydatischen Oxydationsrolle sehen BHUYAN et al 1970 in der Katalase einen Sauerstofflieferanten für ein schlecht versorgtes Organ - die avaskuläre Linse, die ohne direkten Zugang zu sauerstoffbeladenem Hämoglobin ihren Sauerstoffbedarf nur per diffusionem über das Kammerwasser beziehen kann.

Bei einem Vergleich der Katalaseaktivität verschiedener Augengewebe wies MAYER 1979 auf einen auffallend hohen Wert im Glaskörper

hin, wenn man die Werte zum Eiweißgehalt in Relation setzt (noch unveröffentlichte mündliche Mitteilung).

Wie PIRIE (1965) zeigte, ist im Kammerwasser H_2O_2 nachweisbar, im Gegensatz hierzu ist jedoch keine Katalase vorhanden (BHUYAN und BHUYAN, 1970).

PIRIE zeigte, dass H_2O_2 in die Linse diffundieren kann. Auf diese Weise würde der durch Katalase aus dem diffundierten Wasserstoffperoxyd gewonnene Sauerstoff zu einer Verbesserung der Linsenversorgung beitragen. An Kaninchenlinsen, in denen eine Katarakt durch 3-Amino-1,2,4 -Triazol (Amizol) induziert wurde, untersuchten BHUYAN et al 1973 den Katalasegehalt in Vergleich zu normalen, ungetrübten Kaninchenlinsen. Die Katarakt gleicht morphologisch anderen experimentellen Kataraktformen. Der katalasehemmende Effekt des Amizols war bereits bekannt (HEIM, 1956).

Bei den Experimenten ergab sich ein Absinken der Katalaseaktivität der getrübbten Linse um 83% gegenüber der Normallinse des Kaninchens.

1977 fand GÖTZ eine proportionale Aktivitätsminderung von Katalase bei zunehmender Trübung in menschlichen Kataraktlinsen. Der Katalaseverlust lag dabei weitaus höher als es dem gesamten Eiweißverlust entsprach. MAYER berichtete 1970 über Katalaseaktivität inkubierter Kälberlinsen, die sie bis zu 24 Tage zur Beurteilung der Überlebensfähigkeit des aeroben Stoffwechsels beobachtete.

3. MATERIAL und METHODE

3.1. MATERIALGEWINNUNG

Die Untersuchungen erfolgten an Linsen frisch geschlachteter Kälber. Die Bulbi wurden in Kühlbehältern bei 0° - 6° Celsius ins Labor gebracht und innerhalb der folgenden 2-3 Stunden unter sterilen Bedingungen präpariert.

Wie MAYER nachweisen konnte, erleiden die Zellen unter diesen Bedingungen groÙenteils reversible Veränderungen, die sie mit elektronenmikroskopischen Bildern in ihrem Verlauf zeigen konnte.

3.1.1. Präparation

Der zu verarbeitende Bulbus wurde nach Abspülung mit Aqua bidest unter sterilen Bedingungen auf eine Zellstoffunterlage in eine Petrischale gelegt. Nach dem Auftropfen einer Penicillin-Streptomycin-Lösung erfolgte eine nochmalige Reinigung mit physiologischer Kochsalzlösung. Dann wurde die Vorderkammer am Limbus mit einer Rasierklinge eröffnet und die Hornhaut mit Schere und Pinzette in toto abgetragen. Nun war es möglich, mit einer Fassungspinzette die Iris zu entfernen. Danach wurden am Linsenäquator die Zonulafasern durchtrennt und die Linse mit Hilfe eines Teelöffels in ein bereitstehendes, mit 20 cm³ Nährmedium gefülltes, steriles 50-cm³-großes Gefäß gegeben.

3.2. ZUSAMMENSETZUNG DES NÄHRMEDIUMS

U.MAYER stellt einen vorbereitenden Vergleich von verschiedenen Nährmedien zur Inkubation von Kälberlinsen an. Darin vergleicht sie die Salzlösungen nach HANK, das Medium nach EARL und EAGLE sowie TCM ohne Serum sowie TCM mit 20% Kälberserum. In letzterem Medium bleiben die Linsen bis zu 4 Wochen lang klar. Dieses Medium wurde von HARDING und Mitarbeitern (1959, 1960, 1962, 1964, 1971), von ROTHSTEIN und Mitarbeitern (1965) sowie von REDDAN und Mitarbeitern (1970) verwendet. Einen Überblick der augenblicklich zur Verfügung befindlichen Kulturmedien geben MORTON sowie KINSEY und Mitarbeiter. Bei vorliegenden Untersuchungen wurden folgende Nährmedien verwandt :

1. Nährmedium ohne Pilocarpinzusatz
 - 80 ml TCM
 - 20 ml Serum (Kalb)
 - 1,5ml Antibiotica
 - 0,5ml Natriumbicarbonatlsg. 0,5%ig

2. Nährmedium mit 0,5% Pilocarpin

80	ml	TCM
20	ml	Serum
1,5	ml	Antibiotica
0,5	g	Pilocarpin
0,25	g	Natriumbicarbonat

3. Nährmedium mit 0,25% Pilocarpin

80	ml	TCM
20	ml	Serum
1,5	ml	Antibiotica
0,25	g	Pilocarpin
0,125g		Natriumbicarbonat

4. Nährmedium mit 0,025% Pilocarpin

80	ml	TCM
20	ml	Serum
1,5	g	Antibiotica
0,025g		Pilocarpin
0,0125g		Natriumbicarbonat

Für die Versuche sinnvolle Konzentration lassen sich von zwei Seiten her eingrenzen. Versuche von U.MAYER liessen erkennen, dass nach Zugabe von 2% Pilocarpin in den Gewebekulturen von Linsenepithel- und Iriszellen kein Zellwachstum mehr erfolgte und die Epithelien vakuolig degenerierten.

Aus der Menge des täglich verbrauchten Sauerstoffs war auf ein Absterben der Epithelien zu schliessen. Auch bei Senkung der Dosis auf 1% blieb das Bild unverändert. Erst mit 0,5 g auf 100 ml TCM gepuffert mit 0,25%iger Bicarbonatlösung lassen biomikroskopisch normale überlebende Epithelien erkennen. Allerdings zeigten sie viel geringeres fibroblastisches Wachstum als unter normalen Umständen. Dies dürfte ziemlich genau mit der Toxizitätsgrenze übereinstimmen. Der andere Grenzwert wird durch den therapeutisch erreichten Pilocarpin-Spiegel gesetzt. GREEN and DOWNS konnten nach Gabe von 2%iger Pilocarpinlösung eine maximale Konzentration von $3,5 \mu\text{g}/0,1 \text{ ml}$ nachweisen. Die Pilocarpinkonzentration von $0,025 \text{ g}/100 \text{ ml}$ liegt somit noch höher als die von GREEN and DOWNS gemessene, reicht jedoch knapp an diejenige heran, die bei häufiger Gabe von 4%iger Pilocarpinlösung beim akuten Glaukomanfall zu erwarten ist.

3.3. VERLAUF DER VERSUCHE

Die nach vorher angegebener Methode gewonnenen Linsen wurden in dem jeweiligen Nährmedium 5 Tage bei 37°Celsius im Brutschrank aufbewahrt. Die Linse ließ sich dann in 10 ml Sörensen-Phosphat-Puffer bei einem pH von 6,8 mit Hilfe eines Ultra-Turrax-Homogenisators homogenisieren. Danach schloss sich ein zweimaliges Einfrieren und Auftauen des Linsenhomogenisats an zur weitestgehenden Zellwandzerstörung und Freisetzung der Katalase. Von diesem Linsenhomogenisat gelangte ein jeweils doppelter Versuchsansatz zur Bestimmung der Katalaseaktivität sowie zur Bestimmung des Eiweißgehaltes der Linse.

3.3.1. Versuch im Warburg-Apparat

Zur Bestimmung der Aktivität der Katalase wurde die von WARBURG (1919) beschriebene manometrische Technik verwendet, über deren vielseitige Anwendungsmöglichkeiten und genaue

Handhabung KOELLE, UMBREIT et al (1964) und ZAPP (1959) berichtet haben. Diese Methode fand unter anderem auch von ZELLER (1953), TIRUNARAYANAN (1956), MAYER und ZIMMERMANN (1962), KIRSCH und BURMEISTER (1966) und HELLER (1969), sowie MAYER (1970) und GÖTZ (1977) Anwendung.

3.3.1.1. Versuchsansatz im Warburg-Apparat

In den Hauptreaktionsraum wurde jeweils 1,8 ml Linsenhomogenisat pipettiert, in das Seitengefäß 0,2 ml einer 3%igen Wasserstoffsuperoxyd-lösung. In jedem Durchgang lief neben 12 derartigen Versuchsansätzen ein Thermobarometer und ein Leerwert parallel mit. Jede einzelne Linse gelangte als Doppelansatz in zwei Gefäßen zur Messung. Das Thermobarometer, nur mit 2,0 ml Sörensen-Phosphat-Puffer gefüllt, diente zum Ausgleich sowohl von Schwankungen der Temperatur wie auch des atmosphärischen Drucks.

Der Leerwert, der mit 1,8 ml Sörensen-Phosphat-Puffer an Stelle des Linsenhomogenisats und 0,2 ml 3%iger Wasserstoffperoxydlösung angesetzt wurde, diente als Kontrolle zum Ausschluß von Verunreinigungen.

3.3.1.2. Technische Durchführung

Die an den Manometer befestigten Reaktionsgefäße ließen sich bei geöffnetem Dreiwegehahn in das Thermostatenbad hängen, das auf 37°Celsius vorgewärmt war. In einer Angleichungszeit von 15 Minuten erfolgte der Temperatúrausgleich zwischen Reaktionsgefäßen und Wasserbad der WARBURG-Apparatur auf 37°Celsius. Dann wurde die Brodie-Säule der Manometer auf 150 mm³ eingestellt, der Manometerhahn geschlossen und durch Einkippen des Wasserstoffsuperoxyds aus dem Seitenarm in das Hauptgefäß die Reaktion in Gang gesetzt. Die Ablesung erfolgte während einer Stunde jeweils im Abstand von 15 Minuten.

3.3.1.3. Berechnung der entwickelten Sauerstoffmenge

Die Gesamtmenge des innerhalb einer Stunde entwickelten Sauerstoffs wurde durch Abzug des Druckwertes des Thermobarometers korrigiert.

Das Ergebnis der Sauerstoffmenge in ul bedarf der Berichtigung durch die Gefäßkonstante zum Ausgleich einzelner Gefäßdifferenzen untereinander, die sich nach folgender Formel berechnet:

$$k = \frac{V_G \times \frac{273}{T} + V_f \times \alpha}{P_o}$$

Dabei bedeutet:

V_G = Vol. Gefäß + Vol. Manometer - Vol. Versuchsmenge

T = absolute Temperatur des Systems

V_f = Volumen der eingegebenen Flüssigkeit

α = Gaskonstante für Sauerstoff

P_o = Normaldruck.

Nach Multiplikation mit der jeweiligen Gefäßkonstanten lässt sich das Ergebnis durch Subtraktion des Leerwertes korrigieren.

Aus den Resultaten der beiden Ansätze für jede Linse erfolgt die Errechnung des Mittelwertes. Zu Beginn der Versuche wurden jeweils drei Ansätze pro Linse geprüft, um die Fehlerbreite der Messungen einschätzen zu lernen. Da sich erwies, dass die Abweichungen der Meßwerte zufriedenstellend gering waren, reichte uns späterhin ein Doppelansatz aus. Der errechnete Sauerstoffwert entspricht der in 1,8 ml Linsenhomogenisat enthaltenen Menge und wird auf die Rechnungseinheit von 1 ml Linsenhomogenisat umgerechnet.

3.3.2. Eiweißbestimmung

Die Messung des Eiweißgehaltes des Linsenhomogenisates erfolgte nach Biuret-Methode wie bei RICHTERICH(1968) beschrieben, wobei sich die Extinktion mit dem Eppendorf-Photometer 1101 M messen ließ bei einer Wellenlänge von

546 mm. Der Eiweißgehalt wurde auf 100 ml Linsenhomogenisat umgerechnet und als Bezugswert für die ermittelte Sauerstoffmenge gewählt, um auf die gewünschte Benennung $\text{O}_2/\text{g\% Eiweiß}$ zu kommen. Dies liegt nahe, da er einerseits den einzig möglichen Bezugswert darstellt: sowohl Größe als auch Gewicht wie die Zusammensetzung der Linse unterliegen großen individuellen Schwankungen. Andererseits erlaubt dieses Bezugssystem die Aussage, ob das Enzym den anderen Proteinen gegenüber bevorzugt oder vermindert synthetisiert bzw. abgebaut wird. Überdies wird auf diese Weise ein Vergleich des Wertes mit demjenigen anderer Gewebe möglich.

4. VERSUCHSERGEBNISSE UND IHRE STATISTISCHE BEWERTUNG

Zur statistischen Auswertung standen 4 Gruppen von Versuchsergebnissen zur Verfügung, die sich durch unterschiedliche Pilocarpin-Konzentration in den Nährmedien kennzeichnen lassen. Es wurden 125 verwertbare Doppelbestimmungen vorgenommen.

Tabelle I : Versuche mit Nährmedium ohne Pilocarpin

Probe Nr.	$\mu\text{l O}_2/1,8 \text{ ml}$	$\mu\text{l O}_2/1,8 \text{ ml}$	Mittelwert $\mu\text{l O}_2/1,8 \text{ ml}$	Mittelwert $\mu\text{l O}_2/1 \text{ ml}$	g Eiweiß/100 ml	$\mu\text{l O}_2/1 \frac{\text{g}}{\text{g}}$ Eiweiß
1	73,63	80,07	76,85	42,69	1,88	22,70
2	103,98	106,00	104,99	58,32	1,81	32,22
3	88,02	79,91	83,96	46,64	1,84	25,35
4	78,46	77,63	78,04	43,36	1,81	23,95
5	74,06	81,54	77,80	43,22	1,91	22,63
6	101,52	99,96	100,74	55,96	1,80	31,09
7	73,62	70,42	72,02	40,01	1,76	22,86
8	84,70	96,00	90,35	50,19	1,81	27,73
9	120,48	116,60	118,54	65,85	1,85	35,59
10	106,58	103,20	104,89	58,27	1,88	30,99
11	76,34	78,75	77,54	43,08	1,81	23,80
12	104,34	104,34	104,34	57,96	1,80	32,36
13	91,65	91,00	91,32	50,73	1,85	27,42
14	106,60	111,51	109,05	60,58	1,83	33,10
15	78,30	79,56	78,93	43,85	1,78	24,63
16	108,90	114,95	111,92	62,18	1,78	34,93
17	72,36	71,82	72,09	40,05	1,82	22,00
18	83,79	76,14	79,96	44,42	1,81	24,54
19	63,04	62,59	62,81	34,89	1,85	18,86
20	89,76	96,84	93,30	51,83	1,76	29,45

Probe-Nr.	ml O ₂ /1,8 ml	ml O ₂ /1,8 ml	Mittelwert ml O ₂ /1,8 ml	Mittelwert ml O ₂ /1 ml	g Eiweiß/100 ml	ml O ₂ /1g% Eiweiß
21	120,96	94,17	107,56	59,75	1,80	33,19
22	116,50	118,74	117,62	65,34	1,79	36,50
23	104,28	84,25	94,26	52,36	1,83	28,61
24	95,85	104,83	100,34	55,74	1,81	30,79
25	102,57	101,49	102,03	56,68	1,85	30,64
26	133,92	107,07	120,49	66,94	1,77	37,82
27	119,59	128,37	123,98	68,88	1,78	38,69
28	133,00	138,65	135,82	75,46	1,79	42,15
29	101,22	106,02	103,62	57,57	1,78	32,34
30	108,45	105,92	107,18	59,55	1,87	31,84
31	127,35	136,28	131,82	73,23	1,68	43,59
32	137,93	129,86	133,90	74,39	1,76	42,67
33	138,52	136,85	137,69	76,49	1,74	43,96
34	109,04	107,38	108,21	60,12	1,72	34,95
35	112,10	121,41	116,75	64,86	1,78	36,44
36	89,41	99,35	94,38	52,43	2,00	26,22
37	114,02	122,51	118,27	65,70	1,79	36,71
38	83,47	83,02	83,24	46,25	1,87	24,73
39	94,35	86,07	90,21	50,12	1,84	27,24
40	115,95	105,05	110,50	61,39	1,83	33,55

Probe Nr.	$\mu\text{l O}_2/1,8 \text{ ml}$	$\mu\text{l O}_2/1,8 \text{ ml}$	Mittelwert $\mu\text{l O}_2/1,8 \text{ ml}$	Mittelwert $\mu\text{l O}_2/1 \text{ ml}$	g Eiweiß/100 ml	$\mu\text{l O}_2/1\%$ Eiweiß
41	107,30	108,36	107,83	59,91	1,90	31,93
42	110,83	97,28	104,06	57,80	1,99	29,05
43	106,29	102,32	104,30	57,95	1,79	32,37
44	107,76	136,80	122,28	67,93	1,95	34,83
45	97,21	96,35	96,78	53,76	1,85	29,06

Tabelle II: Versuche mit Nährmedium mit 0,5% Pilocarpin

Probe Nr.	µl O ₂ /1,8 ml	µl O ₂ /1,8 ml	Mittelwert µl O ₂ /1,8 ml	Mittelwert µl O ₂ /1 ml	Eiweiß/100 ml	µl O ₂ /1 g% Eiweiß
1	57,43	58,11	58,11	32,28	1,85	17,45
2	59,96	63,67	61,82	34,34	1,88	18,27
3	54,66	52,50	53,58	29,77	1,79	16,63
4	57,45	55,22	56,34	31,29	1,79	17,48
5	55,19	58,30	56,75	31,53	1,80	17,51
6	92,65	89,35	91,00	50,55	1,78	28,40
7	61,10	55,09	58,09	32,27	1,89	17,07
8	72,93	73,32	73,12	40,62	1,80	22,56
9	38,01	29,27	33,64	18,68	1,78	10,49
10	63,93	65,55	64,74	35,97	1,82	19,76
11	68,70	82,19	75,44	41,91	1,81	23,15
12	82,59	92,55	87,57	48,65	1,81	26,88
13	60,06	52,92	56,49	31,38	1,73	18,14
14	52,47	49,29	50,88	28,27	1,77	15,97
15	35,14	48,52	41,83	23,23	1,73	13,43
16	43,80	56,15	49,97	27,76	1,73	16,05
17	42,80	40,72	41,76	23,20	1,80	12,89
18	87,06	84,78	85,92	47,73	1,79	26,66
19	57,34	50,41	53,88	29,93	1,86	16,09
20	54,99	56,61	55,80	31,00	1,77	17,51

Probe Nr.	$\mu\text{l O}_2/1,8 \text{ ml}$	$\mu\text{l O}_2/1,8 \text{ ml}$	Mittelwert $\mu\text{l O}_2/1,8 \text{ ml}$	Mittelwert $\mu\text{l O}_2/1 \text{ ml}$	Eiweiß 100 ml	$\mu\text{l O}_2/1 \text{ g\%}$ Eiweiß
21	49,81	41,91	45,86	25,48	1,77	14,39
22	54,87	62,97	58,92	32,73	1,77	18,49
23	72,56	70,45	71,51	39,73	1,77	22,44
24	78,84	79,25	64,05	35,58	1,81	19,66
25	74,25	68,58	71,24	39,68	1,84	21,56
26	66,60	54,42	60,51	33,62	1,81	18,57
27	51,42	45,89	48,66	27,03	1,81	14,93
28	58,61	61,91	60,26	33,48	1,81	18,50
29	60,21	56,70	58,46	32,46	1,77	18,35
30	23,65	36,22	29,94	16,65	1,79	9,29
31	43,93	56,01	50,00	27,78	1,80	15,43
32	72,81	65,12	68,97	38,31	1,77	21,65
33	51,66	49,57	50,62	28,12	1,78	15,80

Tabelle III: Versuche mit Nährmedium mit 0,25% Pilocarpin

Probe-Nr.	ml O ₂ /1,8 ml	ml O ₂ /1,8 ml	Mittelwert ml O ₂ /1,8 ml	Mittelwert ml O ₂ /1 ml	g Elveis 100 ml	ml O ₂ /1 g Elveis
1	61,68	56,43	59,05	32,80	1,81	18,12
2	24,66	21,18	22,92	12,73	1,88	6,77
3	35,37	36,63	36,00	20,00	1,75	11,42
4	20,68	22,18	21,43	11,90	1,79	6,64
5	32,99	39,39	36,19	20,10	1,76	11,42
6	64,05	64,53	64,29	35,71	1,86	19,20
7	28,80	20,19	24,13	13,40	1,68	7,98
8	51,86	55,28	53,57	29,76	1,78	16,72
9	48,03	56,88	52,45	29,14	1,77	16,46
10	31,89	45,88	38,88	21,60	1,72	12,56
11	50,16	47,14	48,65	27,02	1,73	15,62
12	31,88	26,64	29,26	16,25	1,66	9,79
13	48,16	44,44	46,30	25,72	1,92	13,39
14	37,34	43,83	40,58	22,58	1,93	11,68
15	34,96	40,00	37,48	20,82	1,97	10,57
16	49,99	39,64	44,81	24,89	1,89	13,17
17	22,25	18,02	20,13	11,18	1,91	5,85
18	35,37	37,32	36,34	20,19	1,88	10,74
19	34,96	35,30	35,13	19,52	1,76	11,09
20	31,69	34,02	32,85	18,26	1,72	10,62

Probe Nr.	$\mu\text{l O}_2/1,8 \text{ ml}$	$\mu\text{l O}_2/1,8 \text{ ml}$	Mittelwert $\mu\text{l O}_2/1,8 \text{ ml}$	$\mu\text{l O}_2/1 \text{ ml}$	ε Eiweiß 100 ml	$\mu\text{l O}_2/1\%$ Eiweiß
21	42,06	36,92	39,49	21,94	1,76	12,47
22	29,62	32,67	31,15	17,30	1,76	9,83
23	41,17	40,97	41,07	22,82	1,74	13,11
24	45,18	46,13	45,66	25,36	1,75	14,49
25	57,16	59,53	58,35	32,41	1,78	18,21
26	35,80	32,50	34,15	18,97	1,80	10,54
27	41,46	33,64	37,55	20,86	1,58	13,20
28	40,02	52,38	46,20	25,67	1,67	15,37
29	38,95	43,50	41,23	22,90	1,72	13,31
30	30,67	48,30	39,49	21,94	1,72	12,76

Tabelle IV: Versuche mit Nährmedium mit 0,025% Pilocarpin

Probe Nr.	$\mu\text{l } 0,2/1,8$ ml	$\mu\text{l } 0,2/1,8$ ml	Mittelwert $\mu\text{l } 0,2/1,8$ ml	Mittelwert $\mu\text{l } 0,2/1$ ml	Elweiss/100 ml	$\mu\text{l } 0,2/1\%$ Elweiss
1	50,26	57,16	53,71	29,84	1,75	17,05
2	94,88	102,10	98,49	54,71	1,71	31,99
3	65,16	57,96	61,56	34,20	1,72	19,88
4	69,60	89,10	79,35	44,08	1,76	25,05
5	76,08	93,30	84,69	47,05	1,64	28,69
6	61,25	81,60	71,42	39,68	1,72	23,07
7	60,76	53,19	56,97	31,65	1,69	18,73
8	55,83	57,72	56,77	31,54	1,78	17,72
9	98,94	80,70	89,82	49,90	1,62	30,80
10	41,76	64,00	52,88	29,37	1,67	17,59
11	72,96	104,68	88,82	49,34	1,68	29,37
12	88,20	90,32	89,26	49,58	1,66	29,87
13	99,72	89,10	94,41	52,45	1,83	28,66
14	119,72	109,75	114,73	63,74	1,81	35,21
15	97,62	98,76	98,19	54,55	1,61	33,88
16	74,16	68,60	71,38	39,65	1,66	23,89
17	67,26	75,44	71,55	39,63	1,83	21,66

Für die Untersuchung der Mittelwertunterschiede fand eine einfache Varianzanalyse Anwendung, dabei ließen sich Mittelwert, Varianz sowie Standardabweichung errechnen.

Tabelle V: Varianzanalyse

Gruppe	PIL.KONZ.	FALLZAHL	MITTELWERT	VARIANZ	STANDARDABW.
1	ohne	45	31,02	23,60	4,86
2	0,5%	30	18,23	9,23	3,04
3	0,25%	33	12,44	6,81	2,61
4	0,025%	17	25,48	27,60	5,25

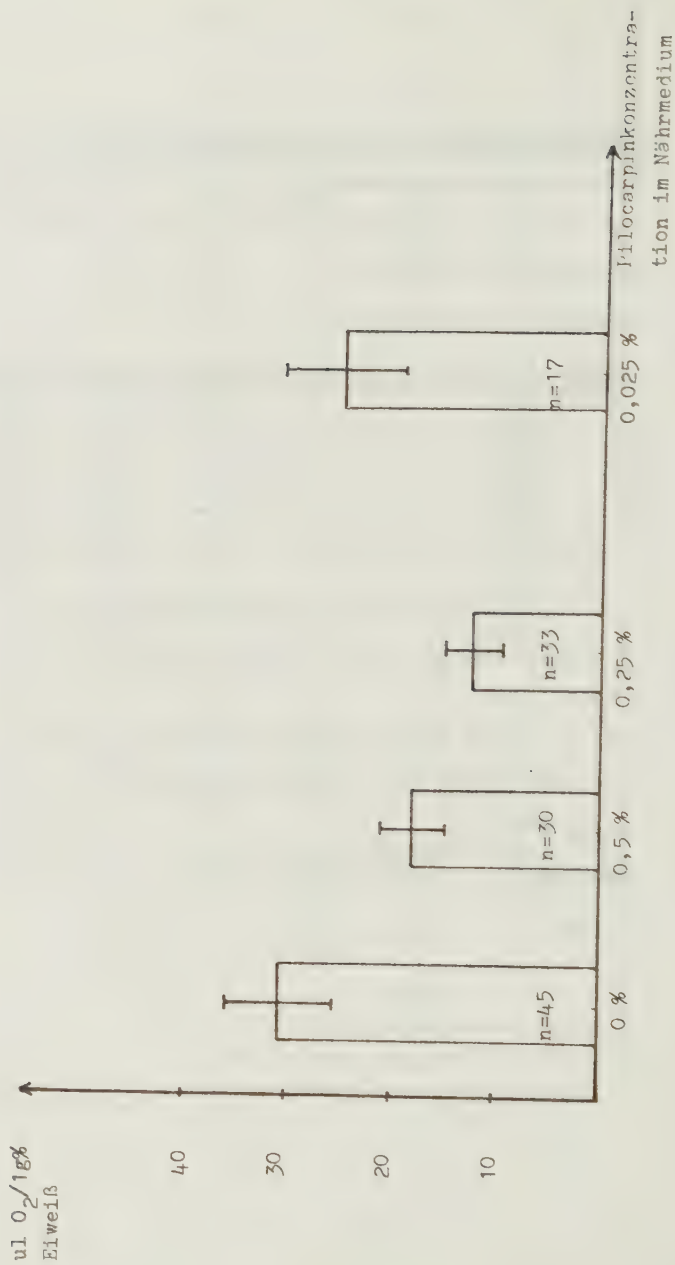
Als a-posteriori-Test für die Paarvergleiche der 4 Gruppen kam der Scheffé-Test zur Anwendung (SACHS 1972).

Der kritische Wert der F-Verteilung mit 3 und 121 Freiheitsgraden bei 1% Irrtumswahrscheinlichkeit liegt bei 3,95.

Tabelle VI: F-Werte nach Scheffé

Gruppe	1	2	3	4
1				
2	17,78			
3	28,56	0,84		
4	10,30	0,07	1,09	

Mittelwerte und Standardabweichung der Versuchsgruppen.



Da bei einem kritischen Wert von F bei 3 und 121 Freiheitsgraden und 1% Irrtumswahrscheinlichkeit $F = 3,95$ alle Paarvergleiche mit $F_{3,95}$ hoch signifikant ($p < 1\%$) unterschiedlich genannt werden, kann als statistisch gesichert gelten:

Die Sauerstoffentwicklung der Gruppe ohne Pilocarpin liegt hoch signifikant ($p < 1\%$) über den Gruppen mit Pilocarpin, während sich die 3 Gruppen mit Pilocarpin untereinander in ihrer Sauerstoffentwicklung nicht signifikant unterscheiden. Morphologisch zeigten sich bei der Gruppe ohne Pilocarpinzusatz sowie mit 0,025% Pilocarpinzusatz auch nach einer Inkubationszeit von 5 Tagen klare Linsen.

Die Gruppe mit 0,25% und 0,5% Pilocarpin im Nährmedium zeigte unterschiedlich starke Trübung, die jedoch nicht quantifiziert wurde.

5.)

DISKUSSION

In den geschilderten Experimenten tritt klar zutage, dass Pilocarpin die Katalaseaktivität in der überlebenden Linse hemmt. Nach MAYER ließ sich in der Warburg-Untersuchung eine Verringerung der Atmung überlebender Linsenepithelien um $\frac{1}{3}$ messen, wie dieses auch von JAKOVLEW polarographisch gezeigt werden konnte. Demnach zeigt sich in den vorliegenden Ergebnissen die gleiche Parallelität zwischen Katalaseaktivität und Atemintensität, wie sie CHODAT in Getreidekörner, BEYE in Kressekeimlingen, GRUMBACH und KIKUTH bei der Entwicklung von aeroben und anaeroben Bakterien feststellten. Als Indikator für eine schädigende Medikamentenwirkung diente das genannte Ferment BEYE bei der Untersuchung von Insektiziden auf Kressekeimlinge und BHUYAN bei der Einwirkung des Horbizides Amizol auf die Augenlinse.

Die Beobachtung von KINOSHITA weist dieselbe Richtung, dass nämlich nach Anwendung des Katalasegiftes Cynid eine Linsentrübung einsetzt. Experimentell bilden die Versuchswerte von MAYER über die Katalaseaktivität inkubierter Kälberlinsen und die Untersuchungen von GÖTZ über diejenige menschlicher Cataractlinsen unterschiedlicher Trübung eine weitere Brücke: Die Katalaseaktivität sank allein mit der Zunahme der Linsentrübung; das zugleich registrierte Lebensalter zeigt keinerlei Auswirkung auf die Katalaseaktivität.

Bei den untersuchten Konzentrationen handelt es sich um Werte, die von der Toxizitätsgrenze(0,5) bis in die Nähe physiologisch denkbaren Mengen (0,025) reichen.

Statistisch fand eine Irrtumswahrscheinlichkeit von $\leq 1\%$ Berücksichtigung, da sich innerhalb der unterschiedlichen, relativ kleineren Gruppen von u-20-50 eine relativ große Streubreite erkennen ließ.

Bei dieser strengen Auswertung fand sich kein Unterschied der Katalaseaktivität innerhalb der einzelnen Konzentrationsgruppen. Es hat demnach den Anschein, dass Pilocarpin entweder die Zellen tötet oder aber unter mehr oder weniger großer Beeinträchtigung des oxydativen Stoffwechsels abgebaut wird. Sein Einfluß ist auch bei der kleinsten der untersuchten Dosierungen nicht zu erkennen. In welchem Maße sich daher eine von MAYER aufgezeigte Wechselwirkung des oxydativen und nicht oxydativen glykolytischen Stoffwechsel, wie sie sich bei Warburg-Messungen am Irisgewebe zeigt, denken lässt, lässt sich bei kritischer Betrachtung der Werte bei 0,5 ml und derjenigen bei 0,25 nicht eindeutig erkennen.

Die Beobachtung jedoch, dass auch nach Zugabe von 0,025% Pilocarpin die Katalaseaktivität hoch signifikant verringert erscheint, erklärt, auf welche Weise und unter Zuhilfenahme welcher Faktoren sich die von HOCKWIN angenommene "Additionswirkung" auf die Kataraktentstehung erklären lässt.

Nach allem lässt sich unter hohen, therapeutisch gerade noch denkbaren Pilocarpinkonzentrationen eine Hemmung der Katalaseaktivität auf 30-50% messen. Diese Hemmung erscheint nach anderen Beobachtungen jedoch nicht ausreichend, um alleine ohne Addition andere Noxen eine Katarakt hervorzurufen.

6.) ZUSAMMENFASSUNG

Es wurde der Einfluß von Pilocarpin auf die Katalaseaktivität untersucht. Dazu wurden Kälberlinsen in TCM 199 und 20% Kälberserum mit unterschiedlichen Pilocarpinzusätzen 5 Tage lang im Brutschrank incubiert. Die Größe des Eiweißgehaltes sowie die Katalaseaktivität in der Linse, die im Warburg-Manometer mittels Sauerstoffentwicklung bestimmt wurde, waren Gegenstand der Untersuchung. Aus den Messungen ergaben sich folgende Resultate:

- a) die Katalaseaktivität der Gruppe ohne Pilocarpin unterschied sich hoch signifikant von allen Gruppen mit Pilocarpinzusatz.

- b) In therapeutisch erreichbaren Konzentrationen verursacht Pilocarpin alleine noch keine Katarakt, jedoch mit anderen unterschwelligen Noxen begünstigt es wohl die Bildung einer Additionskatarakt. Pilocarpin nimmt damit eine Mitverursacherrolle bei der Entstehung einer Katarakt bei mit Pilocarpin langzeittherapierten Glaucompatienten ein.

ABRAMSON, D.H., COLEMAN, D.J., FORBES, M. und FRANZEN, L.A.:

Effect on the anterior Chamber and Lens

Thickness: Pilocarpin.

Arch.Ophthalm.(Chic) 87 (1972) 615

AEBI, H.: Katalase

in BERGMEYER, H.U.: Methoden der enzyma-

tischen Analyse Band I: 636-647

Verlag Chemie (1970)

ASSEFF, G.F., WEISMAN, R.L., PODOS, St.M. und BECKER, B.:

Ocular Penetration of Pilocarpin in

Primates.

Amer.J. Ophthalm.75 (1973) 212

BEYE, F.: Wirkungen von Insektiziden auf die Katalase-
aktivität von Kresse-Keimlingen.

Z. Naturforschg.15b : 470-472 (1960)

BHUYAN, K.C., BHUYAN, D.K. und KATZIN, H.M.:

Amizol-Inducted Cataract and Inhibition

of Lens Catalase in Rabbit

Ophthalm.Res. 5: 236-247 (1973)

BILL, A.: Effects of Atropine and Pilocarpin in

Aqueous Humour Dynamics in Cynomolgus

Monkeys. Ex. Eye Res. 6 (1967) 120

- BILL,A.: Blood Circulation and Fluid Dynamics
in the Eye.
PHys. Rev. 55 (1975) 383
- BORGMANN,H. und WURSTER,W.: Der Einfluß unter-
schiedlicher Konzentrationen und Vehikel
auf die Pilocarpin-Miosis. II. Unterschied-
liche Vehikel. Klin.Mbl.Augenheilk. 163
(1973) 51
- CARENINI,B.B. und ORZALESI,N.: Ricerche sperimentale
sull'azione catarattogena de alcuni
colliri miotici Boll.Oculist.45:847-861(1966)
- CHODAT,R.: Darstellung und Nachweis von Oxydasen und
Katalasen pflanzlicher und tierischer Her-
kunft. Methoden ihrer Anwendung.
In ABDERHALDEN,E.: Handbuch der biologi-
schen Arbeitsmethoden. Vol.IV/1: 397-410
Urban und Schwarzenberg (1939)
- DE CONCILIIS,U.: L'attivita catalasica nei Tessuti
e nei liquidati oculari
Arch.Ottalm. 61 321-339 (1957)

- DRANCE, S.M.: FAIRCLOUGH, M. und SCHULZER, M.:
Dose Reponse of human intraocular
Pressure to Aceclidine Arch. Ophtal. 88:
394-396 (1972)
- ELLIS, Ph.D., LITTLEJOHN, K. und DEITRICH, R.A.:
Enzymatic Hydrolysis of Pilocarpine
Invest. Ophthalmol. 11 747-751 (1972)
- FAINE, S.: Catalase Activity in Pathogenetic
Leptospira J. Gen. Microbiol. 22 1-9 (1960)
- GÖTZ, M.L.: Die Aktivität der Katalase in der unter-
schiedlich getrübbten Linse des Menschen.
Inaugural-Dissertation, Erlangen, 1977.
- GREEN, K. und DOWNS, S.J.: Ocular Penetration of
Pilocarpin in Rabbits.
Arch. Ophthalmol. 98 (1975) 1165-1168
- GRUMBACH, A. und KIKUTH, W.: Die Infektionskrankheiten
des Menschen und ihre Erreger.
Band I: 140-143, 750
Thieme-Verlag, Stuttgart (1958)

HARDING, C.V., DONN, A. und SRINIVASAN, B.D.:

Incorporation of Thymidine by injured
Lens Epithelium Exp. Cell Res. 18: 582-585 (1959)

HARDING, C.V., HUGHES, W.L., BOND, V.P. und SCHORK, P.:

Autoradiographie Localisation of tritiated
Thymidine in whole-mount Preparation of
Lens Epithelium. Archiv. Ophthal. 63: 58-65
(1960)

HARDING, C.V., ROTHSTEIN, H. und NEWMAN, M.B.:

The Activation of DNA-Synthesis and Cell
Division in Rabbit Lens in Vitro
Exp. Eye Res. 1: 457-465 (1962)

HARDING, C.V. und THAYER, M.N.: DNA-Synthesis in the
cultured ocular Lens

Invest. Ophthalmol. 3: 302-313 (1964)

HARDING, C.V., REDDAN, J.R., UNAKARA, N.J. und BACCHI, M.:

The Control of Cell Division in the ocular
Lens. Int. Rev. Cytol. 31 215-299 (1971)

HARRIS, J.E.: Problems in Drug Penetration in

LEOPOLD, I.H.: Symposium on ocular Therapy 3:99
ff. (1968) Verlag C.V. MOSBY

- HARRIS, L.S., GALIN, M.A. : Effect of ocular Pigmentation on hypotensive response to pilocarpin.
Amer.J.Ophtal. 72 (1971) 923
- HEIM, W.G., APPLEMAN, D. and PAFROM, H.I. :
Effects of 1,2,4-triazole on catalase and other compounds.
Amer.J.Physiol. 186: 19-23 (1956)
- HELLER, H. : Bedeutung der Katalase für die Praxis
Med.Welt 45: 2482-2487 (1969)
- HERMEL, H. und HAVEMANN, R. : Über den Mechanismus der Katalase-Wasserstoffperoxyd-Reaktion.
Biochim.Biophys.Acta 128: 283-295 (1966)
- HEYNINGER, R.van: Some glykolytic Enzymes and Intermediates in the Rabbit Lens.
Exp.Eye Res. 4 (1965) 298
- HOCKWIN, O. und KOCH, H.-R. : Arzneimittelnebenwirkungen am Auge . Gustav Fischer -Verlag, Stuttgart, New York 1977, Seite 62/63

HOCKWIN, O., OKAMOTO, T., BERGEDER, H. D., KLEIN, W.,
FERRARI, L. und STREIT, W.:

Genesis of Cataracts: Cumulative Effects
of subliminal naxious Influences.

Ann.Ophthal.1: 321-325 (1970)

JAKOVLEV, A. A.: Die Untersuchung der Sauerstoffspannung
in den Geweben und im Kammerwasser des
Auges mit Hilfe der Polarographie
Albrecht v. Greafes Arch.Ophthal.185
(1972) 108

KARLSON, P.: Kurzes Lehrbuch der Biochemie S. 171
Thieme-Verlag (1974)

KEILIN, D. and HARTREE, E. F.: Catalase, Peroxidases and
Metmyoglobin as Catalysts of Coupled
Peroxidatic Reactions.
Biochem. J.60: 310-325 (1955)

KINOSHITA, J. H.: Cataracts in Galactosaemia
Invest.Ophthalmol.4 (1966) 786-799

KINSEY,V.E., WACHTL, C.,CONSTANT,M.A. und COMACHO,E.:

Studies on crystalline Lens; mitotic
Activities in Epithelia of Lense
cultured in various Media.

Amer.J.Ophthalmol.40:216-223 (1955)

KIRSCH,W. und BURMEISTER,W.:

Bestimmung der Serum- und Plasma-
katalase beim Menschen unter verschiede-
nen physiologischen und pathologischen
Bedingungen.

Archiv.f. Kinderheilkd. 174:153-161(1966)

KLAMERTH,O.: Katalasegehalt virusinfizierter Gewebe.

U.Naturforschg. 15b: 448-449 (1960)

KOCH,H.R., DÜMLING,H.,HOCKWIN,O. und RAST, F. :

Investigations on the Influence of
Oxyphenbutazone on Formation of Galactose-
induced Cataracts in Rats Ophthal.

Res. 2: 60-63 (1971)

KOELLE,O.: Manometrie

Braun Apparatebau ,Melsungen (1976)

KOVACIK, L., MRAZOVA E. und JEZEK, L. :

Acétylcholine du corps ciliaire des
bovins et action cholinergique de la
pilocarpine.

Arch.Opht.(Paris) 36 n°3(1976)249-252

KREJCI, L. und HARRISON, R.: Epinephrine Effects on
corneal Cells in Tissue Culture.

Arch.Ophthal.84 (1970) 766-769

LEHNARTZ, E.: Chemische Physiologie: 75 287,305

Springer-Verlag (1949)

LIEBERMANN, L.: Beiträge zur Kenntnis der Ferment-

wirkungen. V.Versuche über H_2O_2 -Katalyse
mit einigen Extracten thierischen
Ursprungs. PFLÜGER's Arch.f.ges.

Physiol.104 : 203 (1904)

LOEW, O.: Catalase a new enzyme of general occurence

Dept.Agric.Rep. 68: 47 (1901)

- LYONS, J.S. und KROHNS, D.L. : Pilocarpin Uptake by
pigmented and uveal Tissue.
Amer.J.Ophthal. 75 (1973) 885
- MAYER, U. und ZIMMERMANN, W.: Katalase und Virulenz
bei Salmonella typhimurium.
Ztschr.f.Hyg. 149 : 44-56 (1962)
- MAYER, U.: Katalasebestimmungen bei Stämmen von
Salmonella typhimurium verschiedener
Virulenz und Resistenz unter Berücksichtigung von Atmungsaktivität und
Vermehrungsgeschwindigkeit;
Inaugural-Dissertation, Homburg/Saar, 1962.
- MAYER, U.: Katalaseaktivität inkubierter Kälber-
linsen. Albrecht v.GRAEFE's Arch.klin.
exp.Ophthal. 181 : 31-35 (1970).
- MAYER, U.: Untersuchungen an Gewebekulturen aus
Kälberaugen. Habilitationsschrift
Erlangen (1974).
- MAYER, U.: Wirkung des Pilocarpins auf den Stoff-
wechsel von überlebenden Linsenepithelien
und Irisgewebe. Sonderdruck Klin.Mbl.
Augenheilk. 168 (1976) 531-537

- MIDDLEBROOK, G. and COHN, M.L. : Some Observations on
the Pathogenicity of Isoniazid-Resistant
Variants of Tubercle Bacilli.
Science 118: 297-299 (1953)
- MORTON, H.J. : A Survey of Commercially available Tissue
Culture Media. In Vitro 6: 89-108 (1970)
- MÜLLER, H.K., HOCKWIN, O. und KLEIFELD, O. : Die Bestimmung
von Pilocarpin im Kammerwasser mit Hilfe
der Polarographie.
Albrecht v. Graefes Arch. Ophthal. 162 (1960) 107
- NICHOLLS, P. : Activity of catalase in the red cell.
Biochim. Biophys. Acta 99: 286-297 (1965)
- NORDMANN, J. und GERHARD, J.P. : A propos de la cataracte
par miotiques. Bull. Soc. Ophthal. Fr. 69 (1969) 649
- PHOJOLA, S. und RÄIVIO, K. : Cataracta zonularis bei idio-
pathischer infantiler Hypoglykämie.
Klin. Mbl. Augenheilk. 159 (1971) 773-780
- PIRIE, A. : Glutathione Peroxidase in Lens and a
Source of Hydrogen Peroxide in Aqueous
Humour. Biochem. J. 96: 244-253 (1965)

- RAMER, R.M. und GASSET, A.R.: Ocular Penetration of
Pilocarpin: The Effect of pH on the Ocular
Penetration of Pilocarpin.
Ann.Ophthal. 7 (1975) 293
- REDDAN, J.R., CROTTY, M.W. und HARDING, C.V.: Characteri-
sation of macromolecular Synthesis in the
Epithelium of cultured Rabbit Lenses.
Exp.Eye Res. 2: 165-174 (1970)
- REDDAN, J.R., HARDING, C.V., UNAKARA, N.J. und BELL, R.M.:
Electron Microscopy of cultured mammalian
Lenses. Invest.Ophthal, 2: 496-515 (1970)
- RICHTERICH, R. : Klinische Chemie 460-461
Akademische Verlagsgesellschaft (1968)
- ROTHSTEIN, H., LAUDER, J.M. und WEINSIEDER, A.: In vitro
Culture of amphibian Lenses .
Nature 206: 1267-1269 (1965)
- ROTHSTEIN, H., REDDAN, J.R. und WEINSIEDER : Reponse to
Injury in the Lens Epithelium of the Bull
Frog Rana catesbeiana. II Spatio-temporal
Patterns of DNA-Synthesis and Mitosis
Exp.Eye Res. 37 440-451 (1965)
- SACHS, L.: Statistische Auswertungsmethoden
Springer-Verlag, Berlin, Heidelberg, New York (1972)

- SCHÖNBEIN, C.F.: J. Prakt.Chemie 89: 323 (1863)
(zitiert nach BERGMAYER)
- SENER, G.: Das wasserstoffsuperoxyd-zersetzende
Enzym des Blutes.
Zeitsch.f.Physik.Chemie:44 257(1903)
(zitiert nach ABDERHALDEN).
- SUMNER, J.B. and DOUNCER, A.L.: Crystalline catalase
J.Biol.Chem.121 417 (1937)
- TIRUNARAYANAN, M.O. and VISCHER, W.A.: Effect of Isoniazid
on Catalase and Peroxidase of
Tubercle Bacilli
Die Naturwissenschaften 43:474-475(1956)
- THENARD, L.J.: Ann.Chim.Phys.11: 85 (1819)
zitiert nach BERGMAYER
- THOERELL, H.: Über die Wirkungsweise der Katalasen
Experimenta 4: 100-109 (1948)
- UMBREIT, W.W., BURRISS, R.H. and STAUFFER, J.F.:
Manometric Techniques
Burgess Publishing Company
Minneapolis (1964)

- WARBURG, O.: Biochem. Z. 100: 230 (1919)
(zitiert nach ZAPP)
- WARBURG, O., SCHRÖDER, W. und GATTUNG, H. W. : Über die
Wirkung von Röntgenstrahlen auf
Hämoglobin. Z. Naturforsch. 15 b: 163-166 (1960)
- WEBER, A.: Zit. nach WOLLENSAK, J. und KEWITZ, H.:
100 Jahre Pilocarpin in der Augenheil-
kunde. Klin. Mbl. Augenheilkunde
169 (1976) 660-663
- WOLLENSAK, J., KEWITZ, H.: 100 Jahre Pilocarpin in
der Augenheilkunde .
Klin. Mbl. Augenheilk. 169 (1976) 660-663
- ZAPP, F. J., KOELLE, O., KUHN, H. und FRANKE, E.:
Anwendungsmöglichkeiten der Warburg-
Apparatur im Krankenhaus-Laboratorium .
Münch. Med. Wochenschr. 39 1701-1706 (1959)
- ZELLER, E. A.: Contributions to the enzymology of
the normal and cataractous lens III. On
the catalase of the crystalline lens
Amer. J. Ophthal. 36 : 51-53 (1953)
- ZENTMAYER, W., POSEY, W. C.: A clinical study of 167 cases
of glaucoma simplex.
Archiv. Ophthal. (Chic.) 24 (1895) 378

Herrn Professor Dr. med. E. SCHRECK danke
ich für die großzügigen Arbeitsbedingungen,
die er mir im Histologischen Labor seiner
Klinik zur Verfügung stellte.

Frau Oberärztin Professor Dr. U. MAYER
danke ich für die Überlassung und Formulierung
des Themas sowie für die freundliche Unter-
stützung und die immer gerne gewährte Hilfe.

LEBENS LAUF

Am 22. September 1949 wurde ich als Sohn des Diplom Ingenieurs Karl Friedrich von Liel und seiner Frau Margarete Resi geb. Freiin von Freyberg in Landshut geboren.

Nach Besuch der Grundschule trat ich in das Humanistische Melanchthon Gymnasium in Nürnberg ein, wo ich 1970 das Abitur ablegte.

Im Wintersemester 1970/71 studierte ich an der Universität Erlangen - Nürnberg Betriebswirtschaftslehre. Im Sommersemester 1971 wurde ich zum Studium der Medizin zugelassen. Das Vorphysikum bestand ich im März 1972, das Physikum nach dem vierten Fachsemester im April 1973. Im August 1976 legte ich an der Friedrich-Alexander-Universität in Erlangen mein Staatsexamen ab.

Die Medizinalassistentenzeit leistete ich vom Oktober 1976 bis Februar 1977 an der kardiologischen Abteilung am Waldkrankenhaus St. Marien in Erlangen ab, den chirurgischen Abschnitt im Stadtischen Krankenhaus Rosenheim von Februar bis Juni 1977, sowie den freien Teil an der Krankenanstalt Kreuth Dr. May von September 1977 bis Juni 1978. Die Voraussetzungen zur Approbation erfüllte ich im Dezember 1978. Vom September 1978 bis November 1979 leistete ich meinen Grundwehrdienst als Truppenarzt beim Gebirgsjägerbatalion 221 in Mittenwald ab. Seit Januar 1980 arbeite ich an der Allgemeinchirurgischen Abteilung des A.K. St. Georg in Hamburg.

Glaus Karlo. Kue

